

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

**Efeito do tratamento prolongado com Insulina e Vitamina E no comportamento
relacionado ao medo em animais diabéticos**

CURITIBA

2014

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

**Efeito do tratamento prolongado com Insulina e Vitamina E no comportamento
relacionado ao medo em animais diabéticos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina
da Universidade Federal do Paraná
como requisito parcial à obtenção do
título de Biomédico.

Orientador: Janaína Menezes Zanoveli

CURITIBA

2014

RESUMO:

O diabetes é uma desordem metabólica crônica caracterizada pela hiperglicemia resultante de uma debilitação no mecanismo regulatório de insulina. Sua prevalência atualmente corresponde a 8% da população mundial, afetando em torno de 382 milhões de pessoas (International Diabetes Federation, 2013). Estudos apontam uma correlação positiva entre o diabetes e transtornos psiquiátricos, como transtornos de humor, ansiedade e outros relacionados ao estresse. Muitos estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos que relacionam o diabetes a estes transtornos psiquiátricos. As causas dessas comorbidades permanecem ainda para serem elucidadas, embora estudos apontem essas complicações psiquiátricas como consequência direta da hiperglicemia crônica ou alterações bioquímicas decorrentes do diabetes, como o aumento do estresse oxidativo. Tendo em vista o exposto acima, esse trabalho teve como objetivo avaliar respostas comportamentais relacionadas a transtornos de ansiedade e transtornos do estresse em animais com diabetes induzido por estreptozotocina. Para avaliar os comportamentos relacionados a ansiedade, mais especificamente o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), foi utilizado o teste do labirinto em T elevado (LTE; avalia respostas de esquiva inibitória e fuga que são relacionados a comportamentos de medo) e o teste de medo condicionado contextual (MCC, sessão 1). Já para avaliar comportamentos relacionados a transtornos de estresse, mais especificamente a extinção de memória condicionada aversiva, foi utilizado o teste de MCC (avalia a resposta de congelamento associada ao medo condicionado e também a extinção de memória condicionada aversiva). A fim de entender uma possível relação da disregulação da glicemia e de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo sobre os comportamentos avaliados no LTE e MCC em animais diabéticos e normoglicêmicos, os animais foram tratados por 4 semanas com o hipoglicemiante insulina ou o antioxidante vitamina E. Animais diabéticos tiveram um prejuízo na extinção da memória aversiva, o que não foi revertido pelo tratamento com insulina. O tratamento com insulina e vitamina E foram capazes de atenuar respostas associadas a ansiedade em ambos animais normoglicêmicos e diabéticos. A vitamina E foi capaz, também, de melhorar a extinção de memória aversiva em animais normoglicêmicos. Estudos mostram que

insulina é capaz de alterar os níveis serotoninérgicos, o que pode correlacionar com seus efeitos ansiolíticos.

ABSTRACT:

Diabetes is a chronic metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulting from an impairment in the regulatory mechanism of insulin. Its prevalence currently accounts for 8% of world population, affecting around 382 million people (International Diabetes Federation, 2013). Studies have shown a positive correlation between diabetes and psychiatric disorders such as mood disorders, anxiety and other stress-related ones. Many studies have been conducted with the intention of better understanding the pathophysiological mechanisms linking diabetes to these psychiatric disorders. The causes of these comorbidities still remain to be elucidated, although studies have indicated these psychiatric complications as a direct consequence of chronic hyperglycemia or biochemical changes resulting from diabetes, such as increased oxidative stress. In this regard, this study aimed to evaluate behavioral responses related to anxiety disorders and stress disorders in animals with streptozotocin-induced diabetes. To assess such behaviors related to anxiety, specifically Generalized Anxiety Disorder (GAD), we used the elevated T maze test (LTE, which evaluates inhibitory avoidance and escape responses that are related to fear behavior) and the contextual fear conditioning test (MCC, session 1). As to evaluate behaviors related to stress disorders, specifically the extinction of conditioned aversive memory, MCC test was used (which assesses the freezing response associated with fear conditioning and also the extinction of aversive conditioned memory). In order to understand a possible relationship between blood glucose dysregulation and parameters related to oxidative stress on the behaviors evaluated in LTE and MCC in diabetic and normoglycemic animals, these animals were treated for 4 weeks with the hypoglycemic insulin or the antioxidant vitamin E. Diabetic animals had an impairment in the extinction of aversive memory, which was not reversed by insulin treatment. Insulin and vitamin E were able to attenuate responses associated with anxiety in both normoglycemic and diabetic animals. Vitamin E was also capable of improving the extinction of aversive memory in normoglycemic animals. Studies have shown that insulin is capable of altering the levels of serotonin, which can be correlated with its anxiolytic effects.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
3.1. Animais.....	5
3.2. Indução do Diabetes por Estreptozotocina.....	5
3.3. Teste do Labirinto em T Elevado.....	5
3.4. Teste do Campo Aberto.....	6
3.5. Teste do Medo Condicionado Contextual.....	6
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	8
4.1. Experimento 1- Insulina.....	8
4.2. Experimento 2- Vitamina E.....	8
4.3. Análise Estatística.....	9
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	10
6. RESULTADOS.....	11
6.1. Insulina.....	11
6.2. Vitamina E.....	13
7. DISCUSSÃO.....	15
8. CONCLUSÕES.....	20
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O diabetes *melittus* é uma doença metabólica crônica e sua prevalência atualmente corresponde a 8% da população mundial, afetando em torno de 382 milhões de pessoas. Em nosso país, estima-se que sejam 11.9 milhões de casos, o que coloca o Brasil na quarta posição dentre os dez países com maior prevalência mundial (International Diabetes Federation, 2013).

Transtornos de ansiedade são alguns dos transtornos psiquiátricos mais presentes dentre a população geral de pacientes com diabetes *mellitus*. Estima-se que 40% dos pacientes diabéticos tenham um aumento de sintomas relacionados à ansiedade e que a prevalência em geral de distúrbios de ansiedade nesses pacientes seja aproximadamente 14% (Grigsby et al., 2002; Kessler et al., 2005; Wittchen, 2001; Leray et al., 2011). As principais distúrbios de ansiedade associadas a doenças metabólicas são o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e o transtorno de pânico (Fava et al., 2010). Sabe-se que pacientes diabéticos geram altos custos hospitalares, seu tratamento chegando a custar, nos Estados Unidos por exemplo, 263 bilhões de dólares anualmente (International Diabetes Federation, 2013). Além disso, esses pacientes sofrem de baixa produtividade, incapacidade de realização de atividades cotidianas e aumento de mortalidade (Lin et al., 2008). Comparados à população em geral, estudos mostram que pacientes diabéticos possuem maior probabilidade de desenvolver transtornos de ansiedade e transtornos relacionados ao estresse como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (Simon et al., 1995; Lloyd et al., 2000; de Groot et al., 2001; Anderson et al., 2002; Von Korff et al., 2005; Lin et al., 2004, 2008). Esses transtornos de ansiedade são um fator de risco crucial para induzir uma piora no controle da glicemia (Lernmark et al., 1999) e eles podem ainda contribuir para o desenvolvimento de subsequentes complicações diabéticas (de Groot et al., 2001) através do descuido do controle glicêmico e da alimentação em geral, levando então a um aumento da glicemia, gerando um ciclo de causa e consequência entre diabetes e esses transtornos. As causas dessas comorbidades permanecem ainda por serem elucidadas, embora estudos apontem essas complicações como consequência direta da hiperglicemia crônica ou alterações bioquímicas decorrentes da mesma, como o aumento do estresse oxidativo (Revsin et al., 2008).

Sabe-se que células neuronais são especialmente sensíveis ao estresse oxidativo pelo seu alto consumo de oxigênio, sua relativamente baixa resistência antioxidante e sua constituição rica em lipídios (Bouayed, 2009). Espécies reativas de oxigênio podem levar a dano tecidual e destruição de componentes celulares (lipídios, proteínas e DNA), o que pode acarretar em morte celular. Em ratos diabéticos, muitos desses danos tem sido observados. Assim, foi observado um aumento de parâmetros indiretos de estresse oxidativo em regiões límbicas relacionadas à memória e comportamento emocional, como no hipocampo e córtex pré-frontal de animais com diabetes induzido pela administração de estreptozotocina (Saravia et al., 2002; Revsin et al., 2005, 2009; de Moraes et al., 2014). Aliado ao aumento do estresse oxidativo em áreas encefálicas, estudos indicam que animais diabéticos apresentam uma resposta comportamental do tipo depressiva e ansiogênica mais pronunciada quando submetidos a modelos animais de depressão e ansiedade, respectivamente (Ramanathan et al., 1998; Wayhs et al., 2010; Ho et al., 2012; de Moraes et al., 2014).

Estudos apontam que a insulina e sua sinalização são críticos para a regulação de mecanismos de memória, regulação de outros neurotransmissores e para a neuroproteção contra doenças neurodegenerativas (Hoyer and Lannert 2007). A sinalização intracelular regulada de insulina tem um papel putativo em diversos aspectos da fisiologia do cérebro (Plum et al. 2005) e alterações nessas vias tem sido consistentemente implicadas na etiologia de desordens psiquiátricas e doenças neurodegenerativas (Hoyer and Lannert 2007).

A ausência do controle da hiperglicemia em pacientes diabéticos tem consequências deletérias para o cérebro, como a potencialização da toxicidade induzida por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e danos neurais (Dasgupta et al., 2013). Em ratos foi observado que o consumo de dietas com altos níveis de carboidratos levando a hiperglicemia aumenta a peroxidação lipídica no córtex frontal e induz comportamento do tipo ansioso no teste do claro/escuro, sem alterar a locomoção dos animais no campo aberto (Souza et al., 2007). Interessante que Desrumaux e cols (2005) mostraram que a deficiência do antioxidante vitamina E no cérebro de camundongos aumentou significativamente os níveis de marcadores centrais de estresse oxidativo, tais como os níveis de peroxidação lipídica, resultando também em comportamento do tipo ansiogênico.

O mecanismo de defesa antioxidante protege as células através da remoção de espécies reativas de oxigênio. Estudos anteriores sugerem uma importante correlação entre a atividade dessas espécies reativas e antioxidantes na patofisiologia de várias desordens neuropsiquiátricas. A vitamina E é considerada a primeira linha de defesa contra peroxidação lipídica, protegendo as membranas das células do dano causado por espécies reativas de oxigênio. (Dragsted, 2008).

A insulina, como um hipoglicemiante e a vitamina E como um antioxidante são, portanto, de grande importância para a manutenção de funções neuronais.

Com base no exposto e tendo em vista as alterações decorrentes da hiperglicemia como o aumento de estresse oxidativo observados em animais com diabetes, este estudo teve como objetivo investigar como o comportamento relacionado ao medo do animal diabético difere do comportamento de animais normoglicêmicos. Para tal, os animais tiveram o diabetes induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina e foram observados em modelos animais capazes de avaliar respostas defensivas relacionadas com o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), Transtorno do Pânico (TP) e Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT). Os modelos utilizados para este fim foram o labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal que permite avaliar duas respostas comportamentais, a esquia inibitória e a fuga, relacionadas respectivamente com o TAG e o TP (Zanoveli et al., 2003). Além disso, o teste de medo condicionado contextual (MCC) foi realizado a fim de avaliar o comportamento desses animais diabéticos em relação a aquisição do medo condicionado, bem como a extinção de memórias aversivas, um modelo relacionado ao TEPT (Ninomiya et al., 2010).

A fim de entender uma possível relação da desregulação da glicemia e de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nos comportamentos defensivos emitidos pelos animais diabéticos, foi estudado o efeito do tratamento prolongado com drogas que atuam no controle da hiperglicemia, bem como no aumento do estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento prolongado com o hipoglicemiante insulina, o antioxidante vitamina sobre as respostas comportamentais emitidas após a exposição em modelos animais que permitem avaliar respostas relacionadas com TAG (esquiva inibitória e medo condicionado contextual), TP (resposta de fuga) e TEPT (extinção de memória aversiva contextual) E em animais diabéticos (hiperglicêmicos-DBT) e animais não diabéticos (normoglicêmicos-NGL).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento de animais com diabetes induzido sobre as respostas de esquiva inibitória, medo condicionado, fuga e extinção de memória condicionada aversiva.

- Avaliar o tratamento prolongado com o hipoglicemiante insulina em animais com hiperglicêmicos pelo diabetes sobre as respostas de esquiva inibitória, medo condicionado, fuga e extinção de memória condicionada aversiva.

- Avaliar a influência do estresse oxidativo decorrente da indução do diabetes através do tratamento prolongado com o antioxidante vitamina E sobre as respostas comportamentais supracitadas.

- Avaliar a atividade locomotora de todos os animais após os diferentes tratamentos no teste do campo aberto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba, com peso entre 180-200g no início do experimento. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento e foram mantidos sob ciclo de luz claro/escuro de 12 h (7:00 às 19:00 h) e temperatura controlada em $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas e legislações exigidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFPR (CEUA BIO/UFPR #668).

3.2 Indução do Diabetes por Estreptozotocina

Após a submissão de 12 horas de jejum, foi administrado via intraperitoneal (ip) 60 mg/Kg/ml de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, EUA; grupo de animais diabéticos-STZ). Três dias após, o diabetes foi confirmado. Para isso, amostras de aproximadamente 5 μL de sangue da veia caudal foram adicionadas em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (*Accu-Check ActiveTM*, Roche) e foram considerados ratos diabéticos (DBT) quando a glicemia foi igual ou superior a 250 mg/dL.

3.3 Teste do Labirinto em T Elevado

Habituação: Na quarta semana após a diabetização e após o tempo determinado de cada tratamento, cada animal foi manipulado pelo experimentador por 5 minutos. A seguir, este animal foi colocado por 5 minutos em uma gaiola de acrílico (24 x 18 x 35 cm) com serragem no assoalho previamente à execução do teste do LTE.

Pré-exposição: Logo após a habituação, cada animal foi exposto por 30 minutos a um dos braços abertos do labirinto em T elevado (LTE). Neste procedimento, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do LTE isolado dos demais braços por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e porção proximal do braço aberto. A pré-exposição tem por objetivo tornar a resposta de fuga potencializada, favorecendo, dessa maneira a detecção do efeito de drogas. Esta potencialização

da resposta de fuga talvez ocorra por diminuir a atividade exploratória dos animais quando recolocados em um dos braços abertos do LTE no dia do teste (Teixeira e cols., 2000).

Teste: Vinte e quatro horas após a pré-exposição, 2 horas após a última injeção de insulina ou 40 minutos após a última aplicação de vitamina E, os animais foram testados no LTE. O teste foi iniciado pela tomada da esQUIVA inibitória. Para tal, cada animal é colocado na extremidade distal do braço fechado e medido o tempo gasto para a saída, com as quatro patas, deste braço (LATÊNCIA BASAL). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de 30 segundos entre elas (ESQUIVA 1 e ESQUIVA 2). O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tomadas de esquivas, é de 5 minutos.

Trinta segundos após o término da tomada da ESQUIVA 2, foi avaliado o comportamento de fuga. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade do braço aberto e medido o tempo gasto para a saída, com as quatro patas, deste braço (FUGA 1). A latência de saída do braço aberto era medida por mais duas vezes (FUGA 2 e FUGA 3) com intervalos de 30 segundos entre elas.

Trinta segundos após a tomada da FUGA 3, cada animal foi colocado individualmente no campo aberto para observação da atividade locomotora.

3.4 Teste do Campo Aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais e foi efetuado imediatamente após o LTE. Para tal, os animais foram colocados em uma arena retangular feita de madeira (50 cm de comprimento, 40 cm de largura e 50 cm de altura), cujo assoalho é dividido em 6 seções. O número de cruzamentos entre essas seções e a distância percorrida são avaliados como parâmetros de atividade locomotora, durante 5 minutos. O campo aberto foi cuidadosamente limpo após cada teste com uma solução de álcool etílico à 5% e seco.

3.5 Teste do Medo Condicionado Contextual

O teste do medo condicionado contextual (MCC) consiste de 2 fases: a fase de condicionamento e a fase teste. O condicionamento de medo contextual (sessão treinamento) foi conduzido conforme descrito pelo nosso grupo de pesquisa (Ninomiya et al., 2010) e conduzido nos mesmos animais com um intervalo de 48

horas após o teste no LTE e campo aberto. A câmara de condicionamento consiste de uma caixa (26x31,5x21 cm; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Três lados da caixa são de aço e o quarto lado é de acrílico, o que permite a análise comportamental do animal. O fundo da caixa consiste de espaços finos de metal conectados a um estimulador elétrico que pode liberar choques elétricos nas patas dos animais.

Duas horas após a última injeção, para a insulina e quarenta minutos após, para a vitamina E, os ratos foram colocados na câmara de condicionamento por 3 minutos e então receberam um choque elétrico nas patas (1,5 mA, com duração de 1s). Após, os animais permaneceram na caixa por mais 1 minuto, retornando em seguida para suas respectivas caixas.

- Sessão teste: consistiu em 3 sessões realizadas em dias consecutivos (S1, S2 e S3). Assim, por 3 dias consecutivos os animais foram re-expostos às câmaras de condicionamento por 9 minutos, mas sem receber o choque elétrico nas patas (Sessão teste 1-3).

O comportamento de congelamento condicionado observado na S1 estaria relacionado não apenas com a memória, mas também com a TAG; já a avaliação de congelamento nas sessões S2 e S3 foram utilizadas como um índice de memória seguindo a reexposição ao contexto (Bitencourt, 2008). Um animal foi considerado em congelamento quando este apresentou uma posição de agachamento estereotipada com completa imobilidade, com exceção de movimentos de respiração.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Todos os experimentos foram realizados a partir da quarta semana após a indução do diabetes com STZ. Apesar de alguns estudos de comportamento serem realizados após 21 dias de indução do diabetes (Gomez e Barros, 2000; Wayhs et al., 2010), dados prévios e recentes do nosso grupo de pesquisa mostram que após 28 dias esses animais apresentam alterações notórias no comportamento defensivo, em processos relacionados ao estresse oxidativo como níveis de produtos da peroxidação lipídica e atividade da superóxido desmutase, bem como na resposta nociceptiva (Schreiber et al., 2012; de Moraes et al., 2014).

4.1 Experimento 1 – Insulina: Efeito do tratamento prolongado com Insulina sobre as respostas relacionadas à ansiedade- esquia inibitória, medo condicionado contextual e fuga, bem como de extinção de memória condicionada aversiva

Neste estudo foi avaliado, em animais NGL e DBT, o efeito do tratamento prolongado (28 dias) com insulina (via subcutânea (sc), 2UI entre 08:00 e 09:00h e 4 UI entre 17:00 e 18:00h) ou seu veículo salina em animais controle normoglicêmicos (NGL) e animais diabéticos (STZ) sobre as respostas de esquia inibitória e fuga (LTE), atividade locomotora (campo aberto) e medo condicionado e extinção de memória condicionada aversiva (MCC). A última injeção de insulina foi aplicada 2 horas antes dos teste do MCC.

4.2 Experimento 2-Vitamina E: Efeito do tratamento prolongado com vitamina E sobre as respostas relacionadas à ansiedade- esquia inibitória, medo condicionado contextual e fuga, bem como de extinção de memória condicionada aversiva

Neste estudo foi avaliado, em animais NGL e DBT, o efeito do tratamento prolongado (28 dias) com vitamina E (via oral, 300 mg/kg, 1 x ao dia das 08:00 as 09:00h) ou seu veículo óleo de milho em animais NGL e DBT sobre as respostas de esquia inibitória e fuga (LTE), atividade locomotora (campo aberto) e medo condicionado e extinção de memória condicionada aversiva (MCC). A última aplicação de vitamina E foi dada por gavagem 40 minutos antes do teste do MCC.

4.3 Análise Estatística

O teste de Levene e Kolmogorov foi inicialmente empregado para assegurar que os dados satisfaziam os critérios necessários de normalidade para se aplicar testes paramétricos. Dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Os dados obtidos após o teste do LTE foram avaliados pela análise de variância (ANOVA de 2 vias) com medidas repetidas para analisar ambos os dados, esquiva inibitória e fuga, sendo o a latência de esquiva e fuga (em segundos) a variável dependente e o tratamento e condição (NGL e DBT) as variáveis independentes, com as tentativas (3 medidas de esquiva ou 3 medidas de fuga) como medidas repetidas.

Para a análise da atividade locomotora, os dados foram submetidos à ANOVA de 2 vias.

A análise dos dados após o teste de condicionamento ao medo contextual foi feita pela ANOVA de duas vias, tendo o tratamento como fator independente e o número de sessões teste (S1-S3) como o fator dependente.

Quando houveram diferenças estatísticas significativas após todas as ANOVAs realizadas para cada dado, essas diferenças entre os grupos foram investigadas aplicando, quando apropriado, o teste de múltipla comparação de Duncan. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

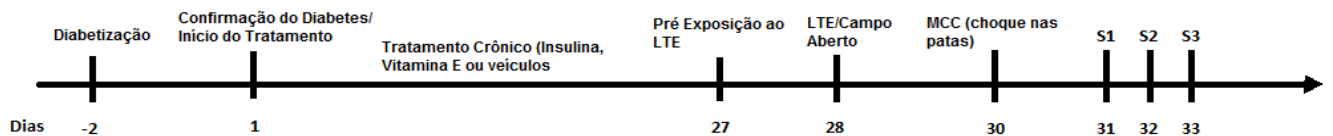


Figura 1: Linha do tempo geral dos experimentos. Após 4 semanas de tratamento crônico com o hipoglicemiante insulina (2 doses diárias, 2UI manhã/4UI tarde) ou o antioxidante vitamina E (via oral, 300 mg/kg, 1 x ao dia das 08:00 as 09:00h) iniciaram-se os testes comportamentais. LTE= teste do labirinto em T elevado; MCC= teste de medo condicionado contextual; S1= sessão 1 do teste de medo condicionado contextual; S2 e S3= sessões de teste para avaliar a extinção de memória aversiva ao contexto.

- Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com tiopental e lidocaína e eutanasiados por decaptação de forma rápida e eficiente, com o mínimo de sofrimento possível para os mesmos.

6. RESULTADOS

6.1 Insulina

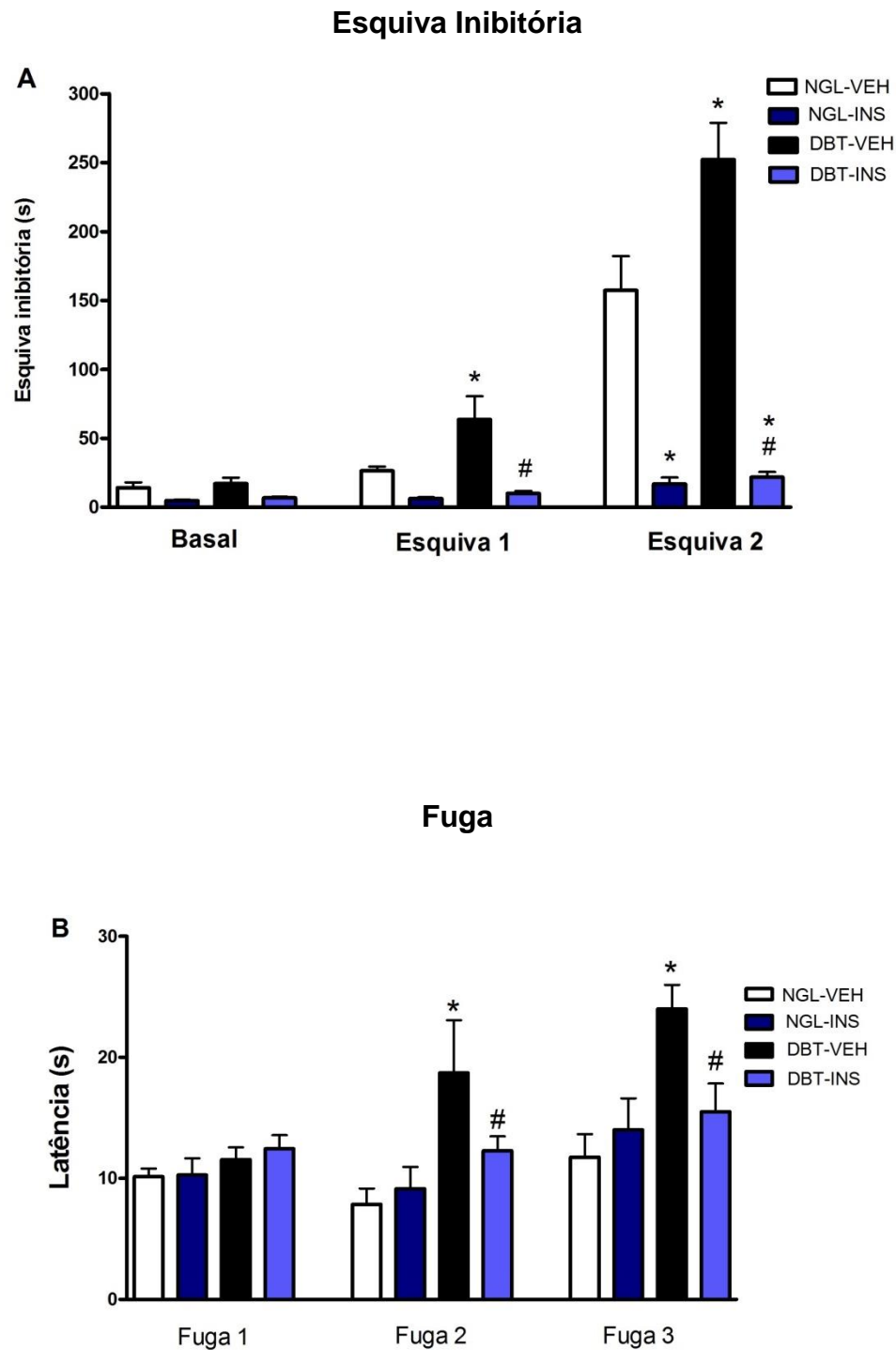


Figura 2: Efeito (média± SEM) do tratamento com insulina (INS, 6UI, s.c.) na esquiva inibitória (s) (painel A) e latência de fuga (s) (painel B) em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) submetidos ao teste do labirinto em T elevado. n = 7-8. * p<0.05 comparado ao grupo NGL/VEH; # p<0.05 comparado ao grupo DBT/VEH

MCC

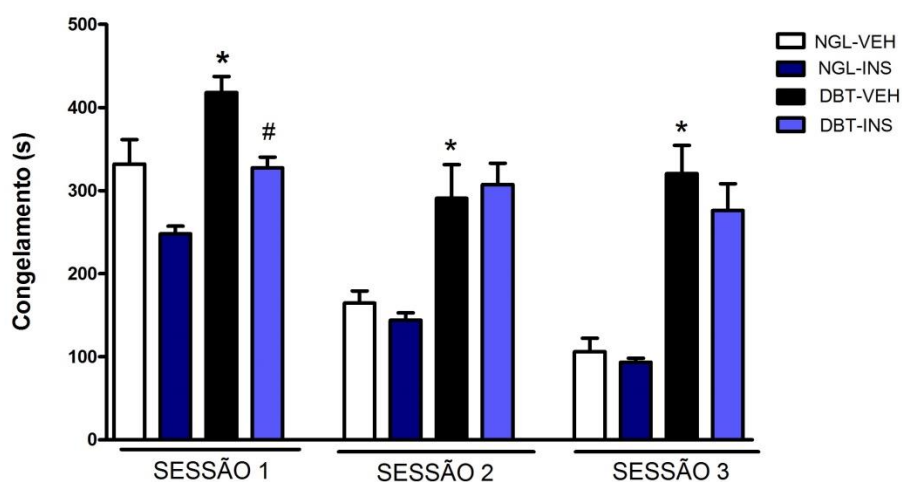


Figura 3: Efeito (média± SEM) do tratamento com insulina (INS, 6UI, s.c.) no comportamento de congelamento em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) submetidos ao MCC. n = 7-8. * p<0.05 comparado ao grupo NGL/VEH; # p<0.05 comparado ao grupo DBT/VEH.

Campo Aberto

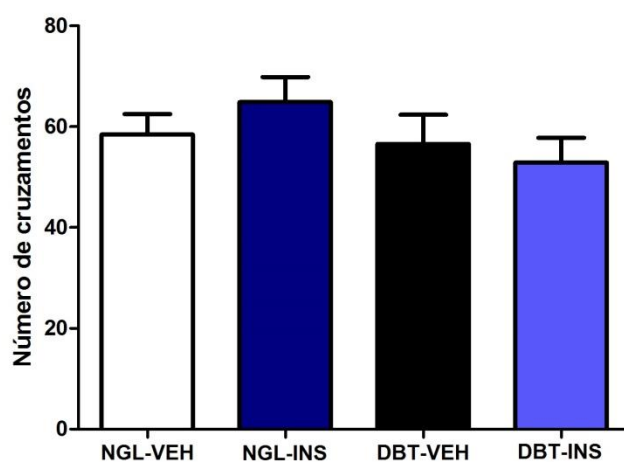
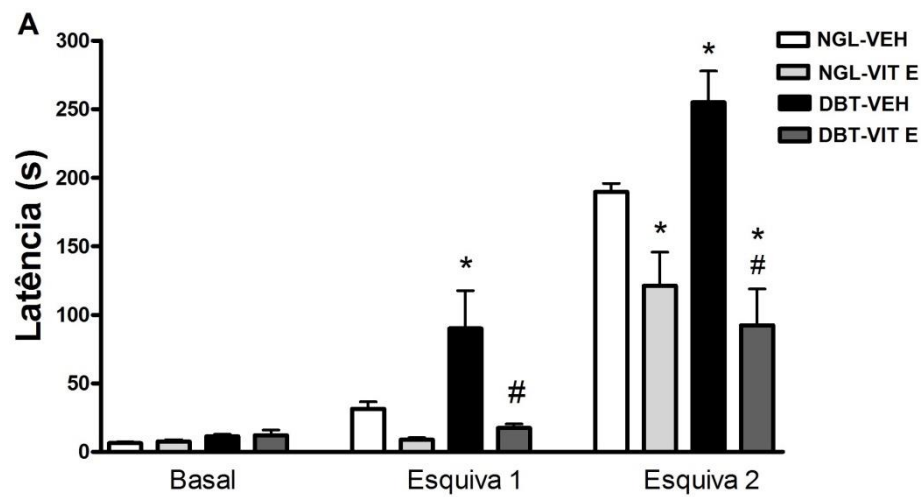


Figura 4: Efeito (média± SEM) do tratamento com insulina (INS, 6UI, s.c.) no número de cruzamentos em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) submetidos ao teste do campo aberto. n = 7-8. * p<0.05 comparado ao grupo NGL/VEH; # p<0.05 comparado ao grupo DBT/VEH.

6.2 Vitamina E

Esquiva Inibitória



Fuga

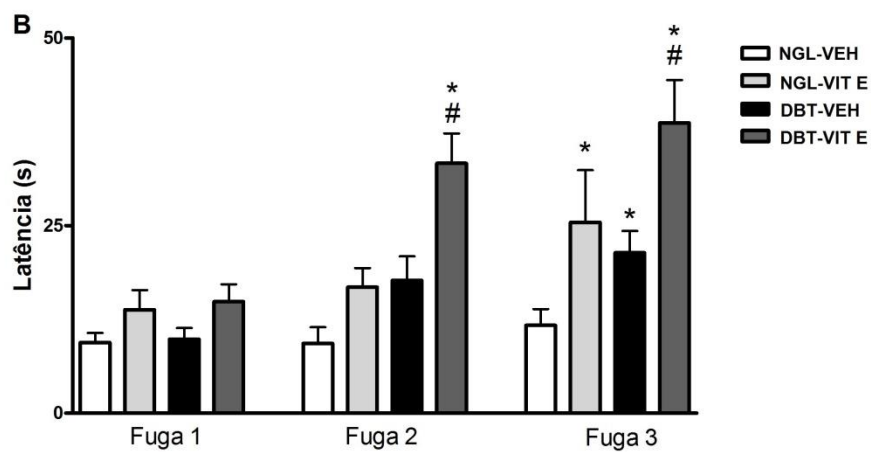


Figura 5: Efeito (média± SEM) do tratamento com vitamina E (via oral, 300 mg/kg) na esquiva inibitória (s) (painel A) e latência de fuga (s) (painel B) em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) submetidos ao teste do labirinto em T elevado. n = 7-8. * p<0.05 comparado ao grupo NGLVEH; # p<0.05 comparado ao grupo DBT/VEH

MCC

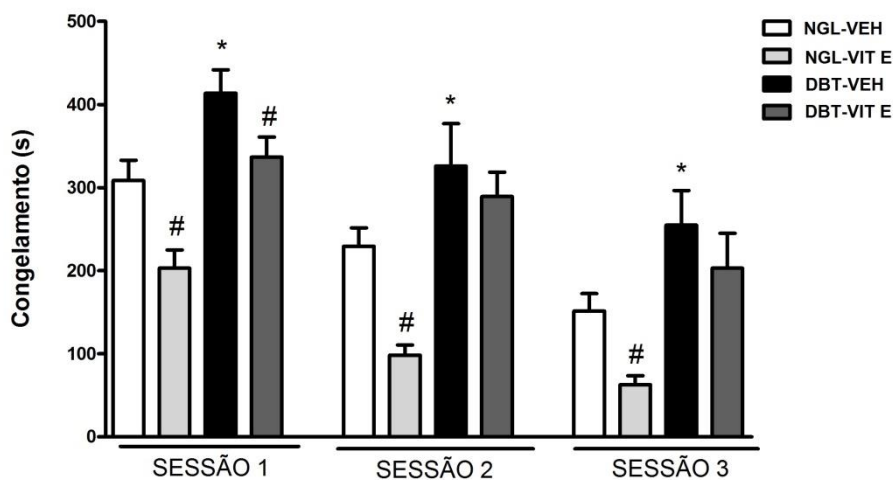


Figura 6: Efeito (média \pm SEM) do tratamento com vitamina E (via oral, 300 mg/kg) no comportamento de congelamento em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) submetidos ao MCC. n = 7-8. * p < 0.05 comparado ao grupo NGL/VEH; # p < 0.05 comparado ao grupo DBT/VEH.

Campo Aberto

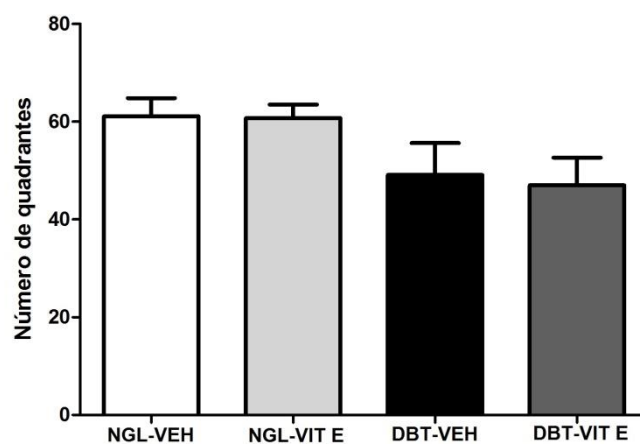


Figura 7: Efeito (média \pm SEM) do tratamento com vitamina E (via oral, 300 mg/kg) no número de cruzamentos em animais normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT) submetidos ao teste do campo aberto. n = 7-8. * p < 0.05 comparado ao grupo NGL/VEH; # p < 0.05 comparado ao grupo DBT/VEH.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar respostas relacionadas ao medo em animais diabéticos, mais especificamente respostas de ansiedade como esquia inibitória, medo condicionado contextual e fuga e também extinção de memória contextual aversiva. Teve como objetivo também aprofundar os estudos investigando se o controle de parâmetros relacionados ao diabetes como hiperglicemia e o estresse oxidativo poderiam não só afetar esses comportamentos relacionados ao medo, mas também servir como potenciais novos alvos no tratamento do diabetes associado à estes transtornos neuropsiquiátricos.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível observar uma resposta relacionada ao medo mais pronunciada em animais diabéticos quando comparados a animais normoglicêmicos. Esses animais, em geral, exibiram respostas relacionadas ao TAG e TP, como a esquia inibitória, mais significativas. Além disso observamos um prejuízo na extinção de memória aversiva de animais diabéticos ao longo das sessões de extinção (S2 e S3), quando em comparação com os animais normoglicêmicos.

O tratamento crônico tanto com insulina quanto com vitamina E foi capaz de atenuar algumas das respostas aversivas induzidas pela hiperglicemia e aumento de estresse oxidativo que os animais diabéticos apresentaram. Os tratamentos tiveram efeitos importantes sobre respostas relacionadas à ansiedade (Figuras 2 e 5), mas não sobre a extinção de memória contextual aversiva (Figuras 3 e 6) em animais com diabetes induzido por estreptozotocina. Nossos resultados em relação ao efeito ansiogênico observado em animais diabéticos corroboram com outros estudos que relatam um aumento de respostas do tipo ansiogênicas em animais com diabetes induzido por estreptozotocina (Gupta et al., 2014a, 2014b; Ates et al., 2014)

O efeito observado em animais diabéticos nos testes realizados no labirinto em T elevado sugere que esses animais apresentam em geral uma resposta do tipo ansiogênica (Figuras 2 e 5). Um resultado interessante é a resposta avaliada dos animais diabéticos no labirinto em T elevado, onde se observa um aumento na latência de fuga desses animais (Figuras 2 e 5). Ao analisar esses resultados através dos parâmetros do teste, essa resposta poderia ser considerada do tipo panicolítica, o que não parece corroborar com as respostas altamente aversivas observadas nesses animais. O diabetes traz diversas alterações no sistema nervoso central associadas com hiperglicemia crônica, como hiperatividade do eixo

HPA, aumento dos níveis de glicocorticóides circulantes, aumento do estresse oxidativo e desregulação de neurotransmissores (Rowland and Bellush, 1989; Kamei et al., 2003; Beauquis et al., 2008; de Moraes et al., 2014). Esse aumento na latência da fuga, observado em animais diabéticos expostos ao braço aberto do labirinto em T elevado parece ser mais relacionado a uma maior susceptibilidade ao estresse nesses animais do que de fato uma resposta panicolítica. Estudos mostram que pré-tratamento numa dose sub-crônica de insulina (5 U/kg, s.c., 2 vezes ao dia) reverte o comportamento do tipo ansiogênico de camundongos diabéticos expostos ao teste de estresse da plataforma aberta elevada (Myiata et al., 2007). Esse comportamento do tipo ansiogênico foi correlacionado com uma diminuição de secreção de serotonina no córtex pré-frontal e a melhora observada no comportamento relacionado à ansiedade após o tratamento com insulina foi também relacionada com a normalização dos níveis serotoninérgicos no córtex pré-frontal. Além disso, animais diabéticos que recebem uma estimulação elétrica na área cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG), um modelo de ataque de pânico, também exibem um comportamento do tipo panicogênico mais intenso em comparação com animais normoglicêmicos (Gambeta et al., dados ainda não publicados). Esses animais que tem a dPAG estimulada eletricamente apresentam um limiar bem menor de corrente elétrica necessária para evocar respostas de fuga, o que sugere um efeito aversivo e panicogênico encontrado em animais diabéticos. Esses estudos sugerem então que o aumento da latência de fuga observado em animais diabéticos expostos ao braço aberto do labirinto seria na verdade relacionado a um prejuízo nas respostas ativas de aversão e um aumento de respostas passivas como o congelamento nesses animais, consequência essa do alto nível de estresse em que eles se encontram.

O tratamento com vitamina E teve um efeito significativo do tipo ansiolítico em animais diabéticos e normoglicêmicos (Figura 5). Vários estudos apontam que uma sinalização redox desregulada pode ser crucial para a patogênese de várias desordens neurológicas, incluindo as ligadas à ansiedade (Pascuan, 2014). Espécies oxidativas são produzidas normalmente através de processos fisiológicos e seu excesso é, geralmente, neutralizado por mecanismos antioxidantes. Mas, em situações adversas, as defesas antioxidantes podem ser insuficientes, resultando em mudanças estruturais e funcionais que podem levar a dano celular (Ischiropoulos e Beckman 2003). Estudos mostram também uma correlação positiva

entre marcadores de estresse oxidativo, tanto periféricos quanto centrais, e comportamentos ligados à ansiedade (Terada, 2011). A vitamina E parece então exercer um efeito neuroprotetor, possivelmente em áreas cerebrais relacionadas ao medo, através do seu potencial antioxidante. Não apenas isso, mas é relatado que a vitamina E pode prevenir a morte de células neuronais através de uma diminuição na atividade da ciclooxigenase-2 (Ezaki, 2005).

Além disso, durante o estresse, o eixo HPA é estimulado e a secreção de glicocorticóides pela adrenal é elevada. Há estudos mostrando que o estresse induzido por imobilização produz tanto estresse psicológico quanto físico. Essa ativação do eixo HPA leva então à liberação de fator de liberação de corticotrofina na região do locus coeruleus resultando, portanto, em uma resposta do tipo ansiogênica. O resultado disso se manifesta através de alteração em respostas comportamentais, secreção de hormônios de estresse como a corticosterona e aumento de estresse oxidativo no cérebro. (Machawal et al., 2014). Essas respostas parecem ser cruciais na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade e ao estresse de condicionamentos aversivos. Estudos mostram que tratamento com vitamina E diminui significativamente os níveis de corticosterona em animais submetidos ao estresse do teste do labirinto em cruz elevado (Terada, 2011).

O tratamento com insulina foi capaz de induzir um efeito ansiolítico importante tanto em animais diabéticos quanto normoglicêmicos (Figura 2- esQUIVA INIBITÓRIA; Figura 4- sessão 1 de MCC), sugerindo que o controle da glicemia induz efeitos benéficos independente da condição desses animais. Esse mesmo efeito foi observado por Gupta e cols (2014b) em camundongos diabéticos quando tratados com insulina por 14 dias no teste do labirinto em cruz elevado e teste da caixa claro/escuro.

Considerando que esse comportamento ansiogênico observado em animais diabéticos seja, dentre outras razões, correlacionado a um desbalanço negativo nos níveis serotoninérgicos no córtex pré-frontal desses animais (Myiata et al., 2007), a melhora observada nesses animais através do tratamento crônico com insulina pode ser relacionada com uma restauração desses níveis de serotonina. Outras alterações benéficas induzidas pelo tratamento com insulina são associadas às suas propriedades neuroprotetoras, pois a insulina é capaz de aumentar a proliferação hipocampal e reduzir o estresse oxidativo no hipocampo e córtex pré-frontal de animais diabéticos (Ho et al., 2012; de Moraes et al., 2014). O tratamento

com insulina foi importante também para a atenuação do aumento de latência na fuga de animais diabéticos no labirinto em T elevado, o que parece estar relacionado com a diminuição do limiar de aversão desses animais frente à situações estressantes.

Apesar desse efeito interessante, animais diabéticos tratados com insulina não tiveram uma melhora da extinção de memória aversiva relacionada ao contexto, quando avaliados nas sessões 2 e 3 do teste de MCC.

Dentre as implicações neurológicas causadas pelo diabetes, encontram-se também distúrbios cognitivos de aprendizagem e memória (Reaven et al., 1990; Ryan, 1988). Foi-se observado também um aumento de retenção de memória relacionada ao medo em animais com diabetes induzido por estreptozotocina, quando avaliados no teste de medo condicionado contextual (Asato et al., 2012). Há várias evidências provenientes de estudos com animais e humanos que indicam que hormônios glicocorticóides (corticosterona em ratos, cortisol em humanos) que são liberados durante estresse e experiências emocionalmente aversivas podem influenciar funções cognitivas e retenção de memória (Roozendaal, 2000). Estudos sobre o efeito da corticosterona, bem como agonistas e antagonistas sintéticos de receptores de glicocorticóides, indicam que a consolidação de memória em vários tipos diferentes de testes, incluindo esQUIVA inibitória, labirinto aquático de Morris e MCC é ampliada por agonistas glicocorticóides e prejudicada por seus antagonistas (McGaugh e Roozendaal, 2002; Roosendaal, 2002).

O tratamento com vitamina E levou a um efeito positivo na extinção de memória aversiva em animais normoglicêmicos, efeito esse que não foi visto em diabéticos (Figura 6). O prejuízo na extinção de memória aversiva em animais diabéticos observado nos resultados deste trabalho, parece estar pelo menos em parte relacionado com a natureza do estímulo desse teste e na intensidade da aversão causada nesses animais que parecem ter um limiar para aversão extremamente baixo. Animais diabéticos apresentam níveis basais de corticosterona extremamente elevados e, portanto, não só a consolidação dessa memória aversiva se faz mais intensa neles do que em animais normoglicêmicos, mas também o tratamento com vitamina E parece não conseguir atuar sobre essa ativação intensa do eixo HPA o suficiente para surtir efeito na extinção de memória condicionada aversiva nesses animais.

Há, portanto, um grande indício que essas memórias condicionadas evocadas por situações aversivas e estressantes em animais diabéticos são bem mais importantes e de difícil extinção, quando em comparação com animais normoglicêmicos (Bellush and Rowland, 1989; Bellush et al., 1991; Flood et al., 1990).

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, esse trabalho mostrou que animais com diabetes induzido por estreptozotocina apresentaram respostas relacionadas ao medo mais pronunciadas, quando comparados aos animais normoglicêmicos. Não só isso, mas foi observado também um importante prejuízo na extinção da memória contextual aversiva nesses animais. Tratamento com insulina e vitamina E foram capazes de atenuar respostas associadas a ansiedade em ambos animais normoglicêmicos e diabéticos. Vitamina E foi capaz, também, de melhorar a extinção de memória aversiva em animais normoglicêmicos. O uso de antioxidantes pode levar a um possível efeito neuroprotetor contra danos oxidativos e comportamento tipo ansioso em animais submetidos a situações estressantes. Estudos mostram que a insulina, além de controlar a hiperglicemia e suas consequências danosas, tende a aumentar os níveis serotoninérgicos, o que pode correlacionar com seus efeitos do tipo ansiolítico em ambos animais normoglicêmicos e diabéticos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson RJ, Grigsby AB, Freedland KE, de Groot M, McGill JB, Clouse RE, Lustman PJ. Anxiety and poor glycemic control: a metaanalytic review of the literature. *Int J Psychiatry Med* 2002;32:235–47.
- Anu Rahal, Amit Kumar, Vivek Singh, Brijesh Yadav, Ruchi Tiwari, Sandip Chakraborty, Kuldeep Dhama. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 761264. Published online 2014 January 23. doi: 10.1155/2014/761264
- Bellush, L. L.; Henley, W. N. Altered responses to environmental stress in streptozotocin-diabetic rats. *Physiol. Behav.* 47:231-238; 1990.
- Berkowitz, B. A.; Head, R.; Joh, T.; Hempstead, J. Experimental diabetes: Alterations in circulating dopamine-B-hydroxylase and norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:18-23; 1980.
- Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996 Sep;45(9):1259-66.
- Bitencourt RM1, Pamplona FA, Takahashi RN. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008 Dec;18(12):849-59. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.07.001.
- Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Apr-Jun;2(2):63-7.
- Broderick PA, Jacoby JH. Central monoamine dysfunction in diabetes: psychotherapeutic implications: electroanalysis by voltammetry. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*. 1989;39(3):211-25.
- Dasgupta A, Pal M, Ghosh T, Roy U, Konar S, Biswas S, Maity C (2013). Differential effects of insulin induced hypoglycaemia upon redox balance in distinct rat brain areas. *Orient Pharm Exp Med* 13(4):279–287.
- de Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. *Psychosom Med* 2001;63:619–30.
- de Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, da Cunha JM, Zanoveli JM. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res*. 2014 Jan 1;258:52-64. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.011. Epub 2013 Oct 16.
- Desrumaux C, Risold PY, Schroeder H, Deckert V, Masson D, Athias A, et al. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J*. 2005;19:296–297. [PubMed]
- Dragsted LO. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *Eur J Nutr*. 2008;47(Suppl 2):3–18.

- Ezaki Y, Nishihara E, Shibata Y, Matsuo T, Kitagawa N, Nagata I, Shinohara K. Vitamin E prevents the neuronal cell death by repressing cyclooxygenase-2 activity. *Neuroreport*. 2005 Aug 1;16(11):1163-7.
- Fava GA, Porcelli P, Rafanelli C, Mangelli L, Grandi S. The spectrum of anxiety disorders in the medically ill. *The Journal of Clinical Psychiatry* 2010;71:910-4.
- Gomez R, Barros HM. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000 Jun;66(2):329-35.
- Grigsby AB, Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Prevalence of Anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *Journal of Psychosomatic Research* 2002;53:1053-60.
- Gupta D, Kurhe Y, Radhakrishnan M. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. *Physiol Behav*. 2014a Apr 22;129:73-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.036. Epub 2014a Feb 28.
- Gupta D, Radhakrishnan M2, Kurhe Y3. Ondansetron, a 5HT3 receptor antagonist reverses depression and anxiety-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice: Possible implication of serotonergic system. *Eur J Pharmacol*. 2014b. pii: S0014-2999(14)00697-9.
- Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav*. 1990 Sep;48(3):429-33.
- Ho N, Balu DT, Hilario MR, Blendy JA, Lucki I. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol Behav*. 2012 Feb 1;105(3):702-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.003. Epub 2011 Sep 10.
- Ischiropoulos H, Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111:163–169
- Jolivald CG, Mizisin LM, Nelson A, Cunha JM, Ramos KM, Bonke D, Calcutt NA. B vitamins alleviate indices of neuropathic pain in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2009;612(1-3):41-7.
- Kamei J, Miyata S, Morita K, Saitoh A, Takeda H. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003 May;75(2):247-54.
- Kamei J, Ohsawa M, Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Modification of the effects of benzodiazepines on the exploratory behaviors of mice on a hole-board by diabetes. *Jpn J Pharmacol*. 2001 May;86(1):47-54.
- Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The synthesis of [14C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J*. 1974 Sep;142(3):673-83.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age of onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry* 2005;62:593-602
- Lebel C. Oxygen radicals: Common mediators of neurotoxicity. *Neurotox Teratol*. 1991;13:341–346.

- Lee, J. H.; Konarska, M.; McCarty, R. Physiological responses to acute stress in aUoxan and streptozotocin diabetic rats. *Physiol. Behav.* 45:483-489; 1989.
- Leray E, Camara A, Drapier D, Riou F, Bougeant N, Pelissolo A, et al. Prevalence, characteristics and comorbidities of anxiety disorders in France: results from the Mental Health in General Ppulation Survey (MHGP). *European Psychiatry* 2011;26:339-45
- Lin EHB, Katon W, Von Korff M, Rutter C, Simon GE, Oliver M, Ciechanowski P, Ludman E, Bush T, Young B. Relationship of depression and diabetes self-care, medication adherence and preventive care. *Diabetes Care* 2004;27:2154–60.
- Lin EH, Korff MV, Alonso J, Angermeyer MC, Anthony J, Bromet E, Bruffaerts R, Gasquet I, de Girolamo G, Gureje O, Haro JM, Karam E, Lara C, Lee S, Levinson D, Ormel JH, Posada-Villa J, Scott K, Watanabe M, Williams D. Mental disorders among persons with diabetes--results from the World Mental Health Surveys. *J Psychosom Res.* 2008;65(6):571-80.
- Lloyd CE, Dyer PH, Barnett AH. Prevalence of symptoms of depression and anxiety in a diabetes clinic population. *Diabet Med* 2000;17:198–202.
- Machawal L, Kumar A. Possible involvement of nitric oxide mechanism in the neuroprotective effect of rutin against immobilization stress induced anxiety like behaviour, oxidative damage in mice. *Pharmacol Rep.* 2014 Feb;66(1):15-21. doi: 10.1016/j.pharep.2013.08.001. Epub 2014 Jan 31.
- Magariños AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):11056-61.
- Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001;25:463–493.
- Mazloom Z, Ekramzadeh M, Hejazi N. Efficacy of supplementary vitamins C and E on anxiety, depression and stress in type 2 diabetic patients: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial. *Pak J Biol Sci.* 2013 Nov 15;16(22):1597-600.
- McGaugh J. L., Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12 (2002), pp. 205–210
- Miyata S, Yamada N, Hirano S, Tanaka S, Kamei J. Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. *Brain Res.* 2007 May 25;1147:233-9. Epub 2007 Feb 4.
- Ninomiya EM, Martynhak BJ, Zanoveli JM, Correia D, da Cunha C, Andreatini R. Spironolactone and low-dose dexamethasone enhance extinction of contextual fear conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34(7):1229-35. Epub 2010 Jul 3.
- Pascuan CG, Simon EH, Genaro AM, Palumbo ML. Involvement of nitric oxide in improving stress-induced behavioural alteration by glatiramer acetate treatment in female BALB/c mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2014 Nov 7.
- Pillai A. Brain-derived neurotropic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals.* 2008;16:183–193.

- Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998 Feb;135(4):361-7.
- Revsin Y, Rekers NV, Louwe MC, Saravia FE, De Nicola AF, de Kloet ER, Oitzl MS. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Feb;34(3):747-58. doi: 10.1038/npp.2008.136. Epub 2008 Sep 10.
- Revsin Y, Saravia F, Roig P, Lima A, de Kloet ER, Homo-Delarche F, De Nicola AF. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Res*. 2005 Mar 15;1038(1):22-31.
- Roozendaal, B. Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78 (2002), pp. 578–595.
- Roozendaal, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25 (2000), pp. 213–238.
- Rowland NE, Bellush LL. Diabetes mellitus: stress, neurochemistry and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 1989 Winter;13(4):199-206. Review.
- Saravia FE, Revsin Y, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Roig P, Lima A, Homo-Delarche F, De Nicola AF. Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. *Brain Res* 2002;957:345–353
- Schein CJ, Kream J, Meyer J, Sternschein M, Gliedman ML. Blood-bile glucose interchanges in normal and diabetic rats. *Am J Surg*. 1969 Jul;118(1):58-60. No abstract available.
- Schreiber AK, Neufeld M, Jesus CH, Cunha JM. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Neuropharmacology*. 2012 Dec;63(8):1286-97. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.08.009. Epub 2012 Sep 1.
- Shimizu H. Alteration in hypothalamic monoamine metabolism of freely moving diabetic rat. *Neurosci Lett*. 1991 Oct 14;131(2):225-7.
- Simon G, Ormel J, VonKorff M, Barlow W. Health care costs associated with depressive and anxiety disorders in primary care. *Am J Psychiatry* 1995;152:352–7.
- Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*. 2007;81:198–203.
- Stranahan A, Mattson M (2010) Stress hormones and neuroplasticity in the diabetic brain. In: Craft S, Christen Y (eds) *Diabetes, insulin and Alzheimer's disease. Research and perspectives in Alzheimer's disease*. Springer Berlin Heidelberg, pp 57–71.
- Taniguchi N, Ohtsuka A, Hayashi K. A high dose of vitamin E inhibits adrenal corticosterone synthesis in chickens treated with ACTH. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2001 Feb;47(1):40-6.

- Tarui S, Yamada K, Hanafusa T. Animal models utilized in the research of diabetes mellitus--with special reference to insulinitis-associated diabetes. *Prog Clin Biol Res.* 1987;229:211-23.
- Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000 Apr;65(4):571-6.
- Terada Y1, Okura Y, Kikusui T, Takenaka A. Dietary vitamin E deficiency increases anxiety-like behavior in juvenile and adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(10):1894-9. Epub 2011 Oct 7.
- Thorré K, Chaouloff F, Sarre S, Meeusen R, Ebinger G, Michotte Y. Differential effects of restraint stress on hippocampal 5-HT metabolism and extracellular levels of 5-HT in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 1997 Oct 24;772(1-2):209-16.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B.* 2007;39:44–84
- Von Korff M, Katon W, Lin EH, Simon G, Ciechanowski P, Ludman E, Oliver M, Rutter C, Young B. Work disability among individuals with diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1326–32.
- Wayhs CA, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas G, Vanzin C, Biancini G, Ferri M, Nin M, Barros HM, Vargas CR. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metab Brain Dis* 2010;25(3):297-304.
- Wittchen HU, Fehm L. Epidemiology, patterns of comorbidity and associated disabilities of social phobia. *The Psychiatric Clinics of North America* 2001;24:617-41.
- Yamato T, Misumi Y, Yamasaki S, Kino M, Aomine M. Diabetes mellitus decreases hippocampal release of neurotransmitters: an in vivo microdialysis study of awake, freely moving rats. *Diabetes Nutr Metab.* 2004 Jun;17(3):128-36.
- Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol.* 2003 Jul 25;473(2-3):153-61